

B1

PCT/EP 02/11973

Federal Republic of Germany

Priority Certificate on the Granting
of a Patent Application

File No.: 101 55 280.7

Application date: 26 October 2001

Applicant/proprietor: Ribopharma AG,
Bayreuth/DE

Title: Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell

IPC: C 12 N 15/63

The appended documents are a true and exact reproduction of the original documents of this patent application.

Munich, 21 November 2002
German Patent and Trademark Office
The President
On authority
[signature]

Waasmaier

Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell

The invention concerns a method as is known, e.g., from WO00/44895.

In vivo study – sample embodiment

Double-stranded RNA (dsRNA), derived from the GFP (green fluorescing protein) sequence, was injected i.v. into "GFP laboratory mice", which express the GFP in all cells carrying on protein biosynthesis. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the GFP expression was investigated in cross sections of the kidney and in the serum as compared to animals who had received the dsRNA not derived from the GFP sequence.

Experiment protocol

Synthesis of the dsRNA

Keeping of the experimental animals and conduct of the experiment

The transgenic laboratory mouse strain TgN (GFPU) 5Nagy was used (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), which expresses GFP (with a beta-actin promotor and a CMV intermediate early enhancer) in all cells thus far investigated (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev 76: 79-90). GFP-transgenic mice can be clearly distinguished from the corresponding wild types (WT) by means of the fluorescence (with a UV flashlight). For the breeding, each corresponding WT was paired with a heterozygotic GFP type.

The investigation was conducted in accordance with the German animal protection provisions. The animals were kept under controlled environmental conditions in groups of 3-5 animals in type III Macrolon cages from the firm Ehret, Emmendingen, at a constant temperature of 20 degrees C and a light/dark rhythm of 12 h. The sawdust litter used was softwood granules 8/15 of the firm Altromin, Lage. The animals received tap water and standard feed Altromin 1324 in pellets (Altromin) ad libidum.

For the experimental procedure, the heterozygotic GFP animals were kept in cages by groups of 3 animals. The injections were given i.v. in the tail vein at a 12 h frequency for 5 days. The injection volume was 60 µl per 10 g of animal and the dose was 2.5 mg of dsRNA or 50 µg per kg of animal. The partitioning into groups was as follows: group A consisted of 6 animals and received PBS (phosphate buffered saline), group B, 2 animals, received 2.5 mg of a control dsRNA (S1 control) per kg, group C, 6 animals, received 2.5 mg of another control dsRNA (S7 control) per kg, group D, 6 animals, received 2.5 mg of dsRNA (GFP-specific, hereafter designated as S1) per kg, group E, 6 animals, received 2.5 mg of dsRNA (GFP-specific, hereafter designated as S7) per kg, and group F, 6 animals, received 50 µg of S1 dsRNA per kg. After the last injection, the animals were killed at a time interval of 14-20 h and organs and blood were harvested.

Organ harvesting

Immediately after the killing of the animals, blood and various organs were removed (thymus, lung, heart, spleen, stomach, intestine, pancreas, brain, kidney and liver). The organs were briefly rinsed in cold, sterile PBS and cut up with a sterile scalpel. One part was fixed in Methyl Carnoys (MC, 60% methanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) for 24 h for immunohistochemical staining; one part was immediately shock-frozen in liquid nitrogen and kept at -180 degrees C for frozen sections and for protein isolation; and another, smaller part was frozen at -80 degrees C for RNA isolation in RNAeasy-Protect (Qiagen). The blood was kept on ice immediately after being withdrawn, centrifuged for 5 min at 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf), and serum was drawn off and kept at -80 degrees C.

Processing of the biopsies

After 24 h fixation in MC, the biopsies were dehydrated in an increasing alcohol series at RT: every 490 min, 70% methanol, 80% methanol, 2 x 96% methanol and 3 x 100% isopropanol. After this, the tissues were heated in the incubator in 100% isopropanol at 60 degrees C, then incubated for 1 h in an

isopropanol/paraffin mixture at 60 degrees C and 3x for 2 h in paraffin, and finally embedded in paraffin. For immunoperoxidase stains, tissue sections of 3 μ m thickness were prepared with a rotation microtome (Leika), pulled onto a slide (Superfrost, Vogel) and incubated for 30 min at 60 degrees C in the incubator.

Immunoperoxidase staining for GFP

The sections were deparaffinized in xylene 3 x 5 min, rehydrated in a decreasing alcohol series (3 x 3 min 100% ethanol, 2 x 2 min 95% ethanol), and then incubated for 20 min in 3% H₂O₂/methanol for blocking of endogenous peroxidases. After 3 x 3 min washing with PBS, incubation was done with the first antibody (goat-polyclonal anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 with 1% BSA/PBS over night at 4 degrees C. The incubation with the biotinylated secondary antibody (1:2000 dilution) took place for 30 min at RT, and then incubation was done for 30 min with Avidin D Peroxidase (1:2000 dilution, Vector Laboratories). After each antibody incubation, the sections were washed 3 x 3 min in PBS. All antibodies were diluted in 1% bovine serum albumen (BSA). The staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was carried out with the DAB Substrate Kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Hematoxylin III was used as the nuclear counterstaining per Gill (Merck). After the dehydration in an ascending alcohol series and 3 x 5 min xylene, the sections were encased in Entellan (Merck). The microscopic evaluation of the staining was done by the IX50 microscope of Olympus, outfitted with a CCD camera (Hamamatsu).

SDS gel electrophoresis for separation of serum proteins

The electrophoretic separation of the serum proteins was done in a Multigel-Long electrophoresis chamber from Biometra with a denaturing, discontinuous 15% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) after Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). For this, a separation gel was first poured with 1.5 mm thickness: 7.5 ml acrylamide/bis-acrylamide (30%, 0.9%), 3.8 ml of 1 M Tris/HCl, pH 8.4, 150 μ l of 10% SDS, 3.3 ml of Aqua bidest., 250 ml of ammonium persulfate (10%), 9 μ l of TEMED (N,N,N',N'-tert.methylene diamine) and coated with 0.1% SDS until polymerization was complete. After this, the collection gel was poured: 0.83 ml of acrylamide/bis-acrylamide (30%, 0.9%), 630 ml of 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 ml of Aqua bidest., 50 μ l of 10% SDS, 50 μ l of 10% ammonium persulfate, 5 μ l of TEMED.

Before being applied onto the gel, every 3 μ l of serum was combined with 6 μ l of Aqua bidest. and 3 μ l of 4x specimen buffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (dithiotreithol), 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol), denatured for 5 min in the heating block at 100 degrees C, briefly centrifuged after cooldown on ice and then applied to the gel. The run was water cooled at RT and constant 50 V. The length standard used was the protein gel marker.

Western Blot and immune detection

The transfer of the proteins from the SDS-PAGE onto a PVDF (polyvinyl difluoride) membrane (Hybond-P, Amersham) was done in the semidry technique after Khyse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) at RT and a constant current strength of 0.8 mA/cm² for 1.5 h. The transbuffer used was a Tris/glycine buffer (39 mM glycine, 46 mM Tris, 0.1% SDS and 20% methanol). As a check for the electrophoretic transfer, both the gels after the blotting and the blot membranes after the immune detection were stained with Coomassie (0.1% Coomassie G250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid). For saturation of unspecific bonds, the blot membrane was incubated for 1 h at RT in 1% powdered skim milk/PBS after the transfer. After that, washing was done three times each for 3 min with 0.1% Tween-20/PBS. All subsequent antibody incubations and washing steps were done in 0.1% Tween-20/PBS. The incubation with the primary antibody (goat-polyclonal anti-GFP) was done for 1 h at RT. After this, washing was done 3 x 5 min and incubation for 1 h at RT with the secondary antibody (donkey anti-goat IgG H_o[r]seradish Peroxidase labeled, Santa Cruz Biotechnology). The detection was done with the ECL system from Amersham, following the manufacturer's instructions.

[figure]

Inhibition of the GFP expression in the serum.

3 μ l each of serum were separated in the 15% SDS-PAGE and quantified in the Western Blot: A) PBS control; B) K1 control (0-22-0); C) K3 control (2-19-2); D) D1 (0-22-2); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 of the D concentration).

Claims

Protection is requested for the following features individually or in combination:

Method for inhibition of the expression of a given target gene in a cell, wherein a double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) is introduced into the cell, and one strand of the dsRNA has a region complementary to the target gene,

characterized in that

the dsRNA is administered in a quantity of not more than 2.5 mg per kilogram of body weight per day.

Method per claim 1, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.

Method per claim 2, wherein the complementary region of the dsRNA has 20 to 24, preferably 21 or 22, consecutive pairs of nucleotides.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.

Method per one of the preceding claims, wherein the 5' end of the dsRNA is smooth.

Method per one of the preceding claims, wherein at least one strand has a projection at the 3' end of the dsRNA.

Method per one of the preceding claims, wherein the projection is formed from 1 to 3 nucleic acids.

Method per one of the preceding claims, wherein the quantity administered per day when using dsRNA with smooth ends is at most 100 µg per kilogram of body weight.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is taken up in a buffer solution for application.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in micelle structures, preferably in liposomes.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced synthetic capsids or structures derived from them.

Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in eukaryotic cells.

Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.

Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

Method per one of the preceding claims, wherein the target gene is a component of a virus or viroid.

Method per one of the preceding claims, wherein the virus is a human pathogenic virus or viroid.

Method per one of the preceding claims, wherein the ends of the dsRNA are modified to counteract a breakdown in the cell or a dissociation into single strands.

Method per one of the preceding claims, wherein the cohesion of the double-stranded structure brought about by the complementary nucleotide pairs is enhanced by at least one, preferably two additional chemical bonds.

Method per one of the preceding claims, wherein the chemical bonding is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.

Method per one of the preceding claims, wherein the chemical bond is formed by purine analogues used in place of purines in the double-stranded structure.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is bound to, associated with, or encased in a viral envelope protein coming from a virus, derived therefrom, or synthetically produced.

Method per one of the preceding claims, wherein the envelope protein is derived from the Polyoma virus.

Method per one of the preceding claims, wherein the envelope protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the Polyoma virus.

Method per one of the preceding claims, wherein upon forming a capsid or capsid-like structure from the envelope protein, one side is turned toward the interior of the capsid or capsid-like structure.

Method per one of the preceding claims, wherein the cell is a vertebrate cell or a human cell.

Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is administered intravenously or intraperitoneally by means of injection or infusion.

Medicament for inhibition of the expression of a given target gene in a cell, containing a double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA), wherein one strand of the dsRNA has a region complementary to the target gene,

characterized in that

the dsRNA is contained in a quantity enabling an administration of not more than 2.5 mg per kilogram of body weight per day.

Medicament per claim 1, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.

Medicament per claim 2, wherein the complementary region of the dsRNA has 20 to 24, preferably 21 or 22, consecutive pairs of nucleotides.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the 5' end of the dsRNA is smooth.

Medicament per one of the preceding claims, wherein at least one strand has a projection at the 3' end of the dsRNA.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the projection is formed from 1 to 3 nucleic acids.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the quantity administered per day when using dsRNA with smooth ends is at most 100 µg per kilogram of body weight.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is taken up in a buffer solution for application.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in micelle structures, preferably in liposomes.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced synthetic capsids or structures derived from them.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in eukaryotic cells.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the target gene is chosen from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the target gene is a component of a virus or viroid.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the virus is a human pathogenic virus or viroid.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the ends of the dsRNA are modified to counteract a breakdown in the cell or a dissociation into single strands.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the cohesion of the double-stranded structure brought about by the complementary nucleotide pairs is enhanced by at least one, preferably two additional chemical bonds.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the chemical bonding is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions, or by metal ion coordination.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the chemical bond is formed by purine analogues used in place of purines in the double-stranded structure.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is bound to, associated with, or encased in a viral envelope protein coming from a virus, derived therefrom, or synthetically produced.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the envelope protein is derived from the Polyoma virus.

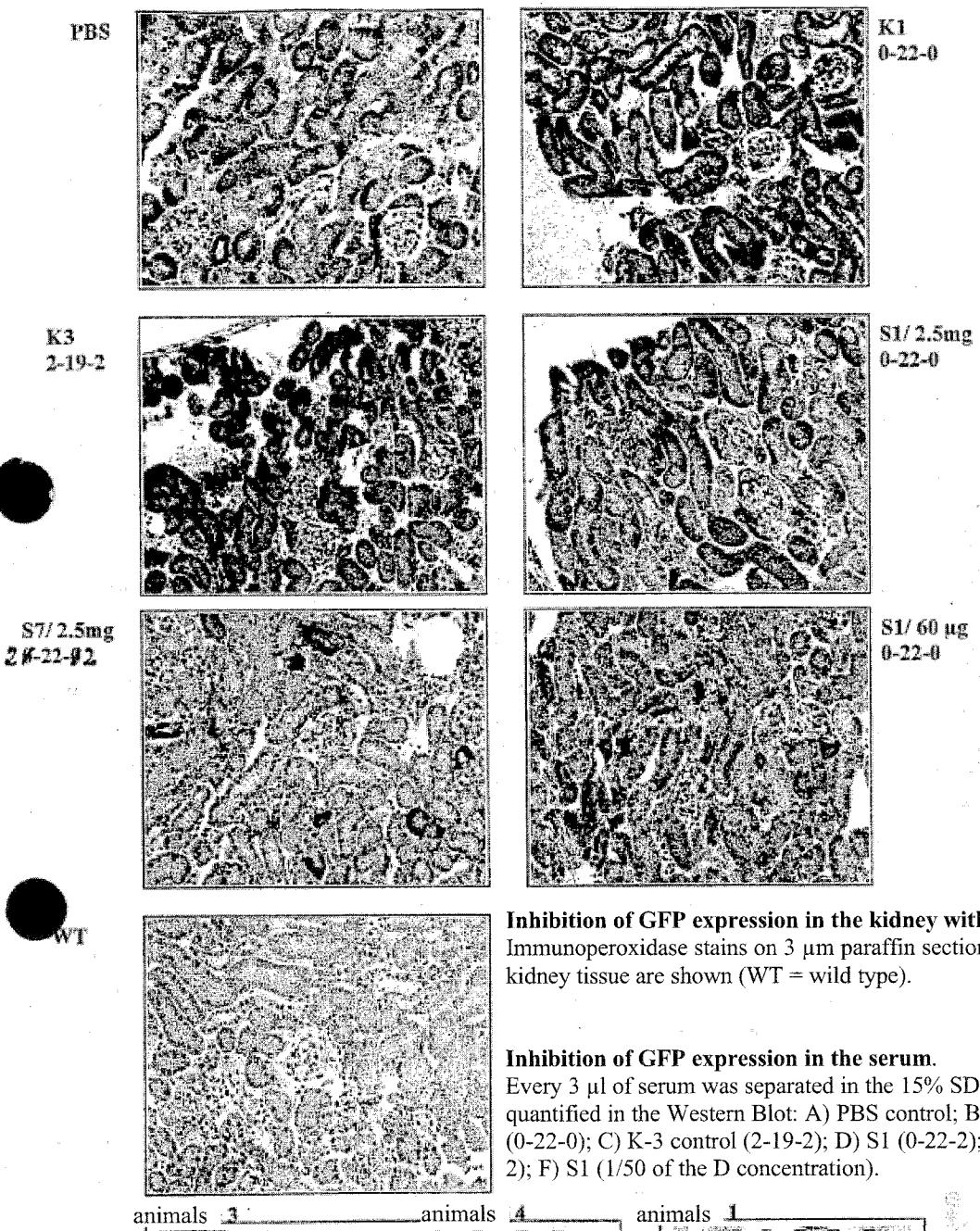
Medicament per one of the preceding claims, wherein the envelope protein contains the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the Polyoma virus.

Medicament per one of the preceding claims, wherein upon forming a capsid or capsid-like structure from the envelope protein, one side is turned toward the interior of the capsid or capsid-like structure.

Medicament per one of the preceding claims, wherein the cell is a vertebrate cell or a human cell.

For an explanation of the aforementioned features, reference is made in particular to WO00/44895, whose disclosure content is hereby incorporated in its entirety.

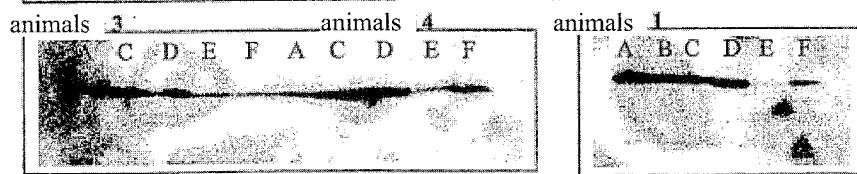
Enclosed: 1 page drawing



Inhibition of GFP expression in the kidney with S7.
Immunoperoxidase stains on 3 μ m paraffin sections of kidney tissue are shown (WT = wild type).

Inhibition of GFP expression in the serum.

Every 3 μ l of serum was separated in the 15% SDS-PAGE and quantified in the Western Blot: A) PBS control; B) K1 control (0-22-0); C) K-3 control (2-19-2); D) S1 (0-22-0); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 of the D concentration).



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 24 DEC 2002
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 55 280.7
 Anmeldetag: 26. Oktober 2001
 Anmelder/Inhaber: Ribopharma AG,
 Bayreuth/DE
 Bezeichnung: Verfahren zur Hemmung der Expression
 eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle
 IPC: C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2002
 Deutsches Patent- und Markenamt
 Der Präsident
 Im Auftrag

Waasmaier

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, wie es z.B. aus der
5 WO00/44895 bekannt ist.

In vivo-Studie - Ausführungsbeispiel

Es wurde „GFP-Labormäuse“, welche das Grün-fluoreszierende
10 Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen
exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-
Sequenz abgeleitet wurde, i.v. injiziert. Am Versuchsende wür-
den die Tiere getötet und die GFP-Expression in Nierenschnit-
ten und im Serum gegenüber Tieren, die dsRNAs erhielten, die
15 nicht aus der GFP-Sequenz abgeleitet war, untersucht.

Versuchsprotokoll

Synthese der dsRNA

Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung

20 Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU) 5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev 76: 79-90). GFP-
25 transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

30 Die Untersuchung erfolgte gemäß den deutschen Tierschutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makrolon-Käfigen

der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten Temperatur von 20°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h gehalten. Als Sägemehleinsteu wurde Weichholzgranulat 8/15 der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Leitungswasser und 5 Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Altromin) ad libidum.

Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen gehalten. Die Injektionen erfolgten i.v. in die Schwanzvene im 12h-Turnus über 10 5 Tage hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Tier und die Dosis betrug 2,5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg Tier. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt: Gruppe A bestand aus 6 Tieren und erhielt PBS (phosphate buffered saline), Gruppe B, 2 Tiere, erhielt 2,5 mg einer Kontroll-dsRNA (S1-Kontrolle) pro kg, Gruppe C, 6 Tiere, erhielt 2,5 mg einer weiteren Kontroll-dsRNA (S7-Kontrolle) pro kg, Gruppe D, 6 Tiere, erhielt 2,5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S1 bezeichnet) pro kg, Gruppe E, 6 Tiere, erhielt 2,5 mg dsRNA (GFP-spezifisch, im weiteren als S7 bezeichnet) pro kg und 15 20 Gruppe F, 6 Tiere, erhielt 50 µg S1-dsRNA pro kg. Nach der letzten Injektion wurden die Tiere im zeitlichen Abstand von 14-20h getötet, Organe und Blut entnommen.

Organentnahme

25 Sofort nach dem Töten der Tiere wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, steriles PBS gespült und mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in 30 Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil

wurde für RNA-Isolierungen in RNAeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme auf Eis gehalten; 5 min bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, Serum abgenommen und bei -80°C gelagert.

5

Prozessieren der Biopsien

Nach 24h Fixierung in MC wurden die Biopsien in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT dehydriert: je 490 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol.

- 10 10 Danach wurden die Gewebe in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leika) Gewebe-15 schnitte von 3 µm Schnittdicke angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

Immunperoxidase-Färbung gegen GFP

- 20 20 Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3% H₂O₂/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde mit dem 1. Antikörper 25 (goat-polyklonaler anti-GFP, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 mit 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 30 3 min in PBS gewaschen. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA) verdünnt. Die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector

Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit Entallan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Serumproteine

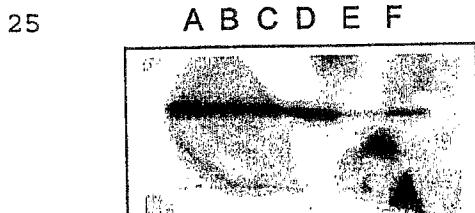
- 10 Die elektrophoretische Auftrennung der Serumproteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyakrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1.5 mm Dicke gegossen: 7.5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0.9%), 3.8 ml 1.M Tris/HCl, pH 8.4, 150 µl 10% SDS, 3.3 ml Aqua bidest., 250 ml Ammoniumpersulfat (10%), 9 µl TEMED ($N,N,N^{\prime},N^{\prime}$ -Tertiamethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0.1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0.83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.9%), 630 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 3.4 ml Aqua bidest., 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat, 5 µl TEMED.

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden je 3 µl Serum mit 6 µl Aqua bidest. und 3 µl 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreithol), 0.02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker verwendet.



Western Blot und Immundetektion

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semi-dry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984), bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm² für 1.5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0.1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal je 3 min mit 0.1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0.1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat-polyklonaler anti-GFP) erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Hoseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.



30

Inhibition der GFP-Expression im Serum.

Je 3 µl Serum wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot quantifiziert: A) PBS-Kontrolle; B) K1 - Kontrolle (0-22-0); C) K3-Kontrolle (2-19-2); D) S1 (0-22-2); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 der D-Konzentration).

Anspruchskomplex

Es wird Schutz für die folgenden Merkmale einzeln oder in Kombination beansprucht:

5

Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, wobei ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist,

10

dadurch gekennzeichnet, daß

die dsRNA in einer Menge von höchstens 2,5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag verabreicht wird.

15

Verfahren nach Anspruch 1, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

20 Verfahren nach Anspruch 2, wobei der komplementäre Bereiche der dsRNA 20 bis 24, vorzugsweise 21 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

25 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das 5'-Ende der dsRNA glatt ist.

30 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zu mindest ein Strang am 3'-Ende der dsRNA einen Überstand hat.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überstand aus 1- 3 Nukleinsäuren gebildet ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Verwendung von dsRNA mit glatten Enden die verbleibte Menge pro Tag höchstens 100 µg pro Kilogramm Körpergewicht beträgt.

5

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.

10 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

15 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.

20 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.

20

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.

25

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.

30 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.

10

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloge gebildet wird.

20

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.

25

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das 30 Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem

Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
5 Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
dsRNA intravenös oder intraperitoneal mittels Injektion oder
Infusion verabreicht wird.

10 Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle, enthaltend ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA), wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist,

15 dadurch gekennzeichnet, daß

die dsRNA in einer Menge enthalten ist, welche eine Verabreichung von höchstens 2,5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag
20 ermöglicht.

Medikament nach Anspruch 1, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

25 Medikament nach Anspruch 2, wobei der komplementäre Bereiche der dsRNA 20 bis 24, vorzugsweise 21 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

30 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das 5'-Ende der dsRNA glatt ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zu-
mindest ein Strang am 3'-Ende der dsRNA einen Überstand hat.

5 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der
Überstand aus 1- 3 Nukleinsäuren gebildet ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei
Verwendung von dsRNA mit glatten Enden die verreichte Menge
10 pro Tag höchstens 100 µg pro Kilogramm Körpergewicht beträgt.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
dsRNA zur Applikation in einer Pufferlösung aufgenommen ist.

15 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, ein-
geschlossen wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
20 dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder
enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon
abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das
25 Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das
Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,
Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.

30 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das
Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien,
exprimiert wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das
5 Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle
10 oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der
durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt
der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugs-
15 weise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bin-
dung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-
20 kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwir-
kungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur
25 anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die
dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon ab-
geleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hülupro-
30 tein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das
Hülprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

- 5 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 15 Zur Erläuterung der vorgenannten Merkmale wird insbesondere auch auf die WO00/44895 verwiesen, deren Offenbarungsgehalt hiermit vollinhaltlich einbezogen wird.

Anlage: 1 Blatt Zeichnung

PBS



K1
0-22-0



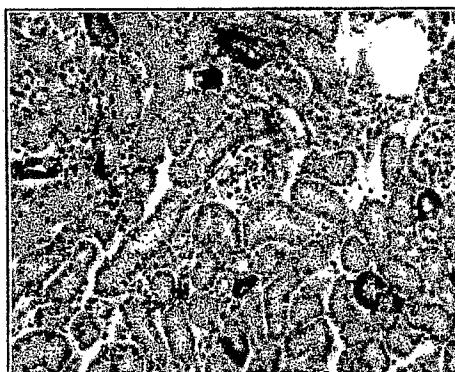
K3
2-19-2



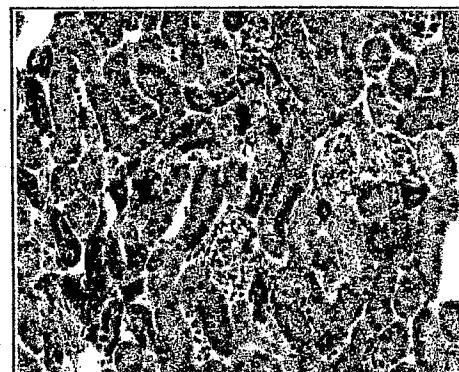
S1/ 2.5mg
0-22-0



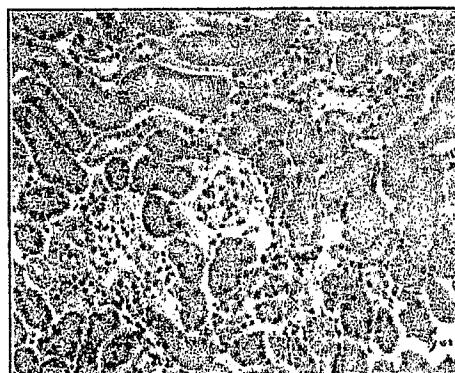
S7/ 2.5mg
2-22-02



S1/ 60 µg
0-22-0



WT



Inhibition der GFP-Expression in der Niere mit S7.
Dargestellt sind Immunperoxidase-Färbungen an 3 µm Paraffinschnitten aus Nierengewebe (WT = Wildtyp).

Inhibition der GFP-Expression im Serum.

Je 3 µl Serum wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot quantifiziert: A) PBS-Kontrolle; B) K1 -Kontrolle (0-22-0); C) K3-Kontrolle (2-19-2); D) S1 (0-22-2); E) S7 (2-19-2); F) S1 (1/50 der D- Konzentration);

Tiere 3



Tiere 4

Tiere 1

